

ESTUDOS VOLUMÉTRICOS DOS NÚCLEOS DOS NEURÔNIOS GANGLIONARES DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818), EM DIFERENTES IDADES

(Com 20 figuras)

P. D. LANZIERI

L. A. CUNHA FILHO

W. A. CHAGAS *

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

INTRODUÇÃO

Estudos cariométricos referentes às células pertencentes à série gametogênica permitem a constatação de uma possível correspondência entre volume nuclear e quantidade da DNA (SCHREIBER, 1947). Em tais células, após o processamento de uma mitose homeotípica, há um intervalo chamado interfase antes do início da divisão seguinte, a qual pode ser feita por meiose e, entre as duas divisões meióticas, ocorre também um intervalo chamado intercinese. A existência desses intervalos entre duas divisões sucessivas determina o aumento da frequência dos núcleos cujo volume corresponde ao volume próprio do estágio cariocinético que antecede o intervalo considerado. Assim sendo, o grau de ploidia, medido pelo número de genomas presentes e evidenciado pelo volume nuclear, pode ser localizado pelas classes de mais alta frequência.

Entretanto, com células somáticas já diferenciadas (SCHREIBER, 1946), a estimação do número de genomas presentes, pela simples medida do volume nuclear é dificultada pela não ocorrência de uma perceptível interrupção do processo de duplicação do DNA entre uma duplicação e outra. Além disso, a possibilidade de ocorrência de sucessivos processos de endomitose com a determinação de sucessivos graus de ploidia (SCHREIBER, 1967), torna a identificação de cada estágio mais problemática ainda. A presença de uma seqüência de processos de endomitoses com as consequentes duplicações do número

de genomas, se evidencia pela constatação de uma grande amplitude de variação dos volumes nucleares das células somáticas mas, a identificação de cada grau de ploidia pelo valor do volume nuclear é bastante difícil, pelas razões expostas.

O problema deverá ser resolvido, sem dúvida alguma, em estudos de medidas diretas ou indiretas da quantidade de DNA em núcleos de diferentes tamanhos (SCHREIBER, 1967). O método utilizado no presente trabalho não é, portanto, o mais indicado, por não ser um método de medida de DNA e sim um método de estimação de DNA pela medida do volume nuclear. Entretanto, a esperança de resolução deste problema, com base em medidas do volume nuclear, justifica o presente trabalho. Mesmo que os resultados obtidos não venham a solucionar completamente o problema, servirão, pelo menos, como informações para uma resolução futura.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado nos neurônios da cadeia ganglionar peri-esofágica de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Os exemplares, de diferentes idades, a partir do nascimento, foram criados nos laboratórios da Cadeira de Parasitologia e Zoologia médica da Escola de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O intervalo entre os diferentes grupos etários foi de 5 dias, desde o recém-nascido (com algumas horas de vida) até os de 40 dias. Também foram estudados os neurônicos de exemplares de idade desconhecida, de dimensão aproximadamente quatro vezes maior que os exemplares de 40 dias.

A fixação foi feita em líquido de Bouin, tendo-se utilizado, pelo menos, seis exemplares para cada grupo etário. A inclusão foi feita em parafina segundo a técnica usual. Os cortes foram realizados na espessura de 10 e 15 micra. As colorações foram feitas pelo Nuclear Fast Red e pela técnica de Feulgen.

Para cada grupo etário foram desenhados em câmara clara (1.875-X) os contornos dos núcleos dos neurônios. Sobre estes desenhos foram medidos, com o auxílio de papel milimetrado transparente, os dois diâmetros transversais, maior e menor. As médias aritméticas destes dois diâmetros, para cada grupo etário, foram agrupadas em classes de intervalo de 0,5 mm. Cada milímetro corresponde a 1 micron.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A orientação seguida na análise estatística visou a estabelecer uma relação entre o crescimento nuclear dos neurônios da espécie estudada e um processo de endomitose que estaria sendo evidenciado pelo aumento do volume do núcleo em consequência de duplicações cromossômicas sucessivas.

Com tal objetivo foram feitas três diferentes análises estatísticas.

Em primeiro lugar foram feitos, em cada idade, e até diferentes idades, os histogramas de frequências dos diâmetros nucleares com o fim de se verificar a possibilidade de reconhecimento, por uma possível constatação de distribuições multimodais, a ocorrência de diferentes e sucessivos graus de ploidia.

Em segundo lugar foi feita, em cada uma das diferentes idades uma tentativa de reunião dos valores dos diâmetros nucleares em classes correspondentes aos possíveis e sucessivos graus de ploidia. Para isso foi considerada como classe diplóide inicial, aquela cujo ponto médio correspondia ao diâmetro de maior frequência na idade de 0 (zero) dias. Com esse diâmetro foi calculado o correspondente volume nuclear pela fórmula

$$V = \frac{D^3}{1,91}$$

pelo que fica implícito que o núcleo foi considerado como uma esfera de diâmetro D . Considerando-se, que, para cada uma das sucessivas duplicações do grau de plóidia a partir do grau inicial diplóide, deveria haver também uma duplicação do volume nuclear, foram calculados os volumes nucleares para cada classe e, com eles, ficaram estabelecidos os pontos médios das diferentes classes relativas aos diâmetros nucleares. Da comparação entre a porcentagem de núcleos diplóides numa idade qualquer com a porcentagem de núcleos diplóides na idade imediatamente subsequente, foi calculada uma porcentagem de duplicação do volume nuclear em cada idade. Com os valores assim calculados foi obtida uma taxa média de duplicação do volume nuclear, a qual foi considerada como a taxa de poliplóidia realizada no espaço de tempo transcorrido entre duas idades consecutivas (5 dias). Pela aplicação dessa taxa de poliplóidia sobre as frequências observadas da classe diplóide em uma idade qualquer, foram obtidas as frequências esperadas na classe diplóide da idade seguinte. De posse das frequências observadas e esperadas, foi aplicado o teste do X^2 com o fim de se verificar se tal taxa de poliplóidia poderia ou não ser tomada para explicar as modificações das frequências relativas observadas nas classes correspondentes a cada um dos sucessivos graus de plóidia verificados com o transcorrer do tempo.

Em terceiro lugar foi determinado o coeficiente de regressão do valor médio dos diâmetros nucleares em cada uma das idades compreendidas entre 0 a 40 dias, sobre a idade em dias. Com os valores estimados dos coeficientes a e b , foi traçada a reta de regressão relativa à função em apreço.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) *Histogramas de frequências das classes correspondentes aos sucessivos graus de ploidia: —*

Os histogramas de frequências dos diâmetros nucleares feitos com intervalo de 0,5 correspondem às figuras numeradas de 1 a 19. Em cada um desses histogramas aparecem assinalados, em baixo, por meio de setas, as classes correspondentes aos valores esperados dos pontos médios das classes de diferentes graus de ploidia. Essas classes estão relacionadas no Quadro I, por seus respectivos limites.

QUADRO I

Limites de classes de diâmetro nuclear, correspondentes aos sucessivos graus de ploidia em neurônios de *Biomphalaria glabrata*.

Limites de classes	Grau de ploidia
6,0 — 6,5	2 N
7,5 — 8,0	4 N
9,5 — 10,0	8 N
12,0 — 12,5	16 N
15,0 — 15,5	32 N
19,0 — 19,5	64 N
24,0 — 24,5	128 N
30,0 — 30,5	256 N
38,0 — 38,5	512 N
48,0 — 48,5	1024 N

Pelo exame das figuras numeradas de 1 a 19 pode-se verificar, em cada uma, as três seguintes situações:

- correspondência entre uma classe modal e um grau qualquer de ploidia.
- correspondência entre uma classe não modal e um grau qualquer de ploidia.
- não correspondência de uma classe modal com quaisquer graus de ploidia.

O número de vezes de ocorrência dessas três situações foi contado na região mais frequente dos 19 histogramas, estando tais números relacionados no Quadro II.

Do exame desses dados vê-se que em todas as idades, desde 0 dias até a idade adulta o número de vezes em que foi verificada correspondência entre uma classe modal e um grau de ploidia foi sempre baixo variando de 0 a 4, sendo o número 1 o mais frequente. Enquanto isso, o número de vezes em que não houve correspondência entre classe modal e um grau de ploidia mostrou um sensível aumento, desde uma vez, na idade de 0 dias, até 11 vezes, na idade adulta. Isso nos leva a concluir sobre a impossibilidade de se considerar a existência de uma correspondência entre classe modal e grau de ploidia na espécie estudada, como regra.

Por outro lado, o aumento contínuo do número de vezes de correspondência entre classe não modal e grau de ploidia a partir da idade de 0 dias em

direção à idade adulta, também nos leva à mesma conclusão.

Com relação aos dados relativos “até a idade adulta”, a conclusão sobre a impossibilidade de se correlacionar as classes modais com os diferentes graus de ploidia é bastante evidente, pois todas as 11 modas encontradas não correspondem a quaisquer graus de ploidia. Com relação a idade “até 40 dias”, 3 modas correspondem a graus de ploidia enquanto que, 13, não correspondem. Com relação a idade “até 35 dias”, duas modas correspondem a graus de ploidia, enquanto que, 13, não correspondem.

Uma tentativa de se deslocar para mais ou para menos a classe considerada diplóide, mantendo-se as demais nos pontos correspondentes ao dobro do volume nuclear da classe anterior, também não modifica sensivelmente esses resultados anteriores, como se poderá verificar pelos dados do Quadro III.

Pelos resultados expostos no Quadro II e no Quadro III pode-se observar que:

- Mais vezes há correspondência entre classe não modal e grau de ploidia do que correspondência entre classe modal e grau de ploidia.
- Em sua grande maioria, as modas constatadas nos histogramas de frequências dos diâmetros nucleares não correspondem a graus de ploidia avaliados pelo volume nuclear.

Desses resultados gerais pode-se concluir que, para a espécie *Biomphalaria glabrata* não é possível a determinação dos sucessivos graus de ploidia nos núcleos dos neurônios pela localização de classes modais em histogramas de frequências dos diâmetros nucleares.

O completo insucesso da tentativa de se relacionar uma classe modal dos histogramas de frequências dos diâmetros nucleares com um grau qualquer de ploidia pode ser explicado como se segue.

Observando-se a modificação da forma dos histogramas desde a idade de 0 dias até a idade adulta, nota-se uma tendência cada vez mais acentuada para uma distribuição assimétrica e unimodal. As pequenas variações para mais ou para menos nos valores das frequências ao longo de cada histograma mais nos parecem uma simples consequência da

QUADRO II

Número de vezes em que houve correspondência entre classe modal e grau de ploidia, número de vezes em que houve correspondência entre uma classe não modal e grau de ploidia e número de vezes em que não houve correspondência entre classe modal e grau de ploidia, nos histogramas de frequências do diâmetro nuclear de neurônios de *Biomphalaria glabrata* em diferentes idades.

Idade	Com correspondência entre classe modal e grau de ploidia	Com correspondência entre classe não modal e grau de ploidia	Sem correspondência entre classe modal e grau de ploidia
0 dias	1	2	1
5 "	4	0	1
10 "	2	2	2
15 "	0	4	4
20 "	1	4	5
25 "	2	4	7
30 "	1	5	7
35 "	1	5	9
40 "	1	4	5
adulta	0	7	11
Total	13	37	52
até 5 dias	3	1	2
" 10 "	3	1	2
" 15 "	1	4	3
" 20 "	1	4	5
" 25 "	2	4	7
" 30 "	2	4	7
" 35 "	2	6	13
" 40 "	3	5	13
" i. adulta	0	7	11

QUADRO III

Número de vezes em que houve correspondência entre classe modal e grau de ploidia, número de vezes em que houve correspondência entre classe não modal e grau de ploidia e número de vezes em que não houve correspondência entre classe modal e grau de ploidia nos histogramas de frequência do diâmetro nuclear de neurônios de *Biomphalaria glabrata* em quaisquer idades até a idade adulta, para diferentes classes consideradas como diplóides:

Valor do diâmetro da classe considerada diplóide	Com correspondência entre classe modal e grau de ploidia	Com correspondência entre classe não modal e grau de ploidia	Sem correspondência entre classe modal e grau de ploidia
5,0	3	6	9
5,5	3	5	9
6,0	0	7	11
6,5	2	5	9
7,0	3	4	8

variação do acaso e não uma sucessão de modas. Se assim fôr, nada há de surpreendente sobre a não correspondência entre as classes consideradas modais nesta discussão e os sucessivos graus de ploidia, pois tais classes não seriam, na realidade, classes modais.

A inexistência de classes modais em correspondência a todos os diferentes sucessivos graus de ploidia, poderia ser explicada de duas formas seguintes.

1) O intervalo entre duas modas reais consecutivas seria tão curto que a superposição das duas curvas estaria mascarando completamente tal aspecto.

2) A duplicação cromossômica e, conseqüentemente, a duplicação do volume nuclear se faria de modo contínuo, sem a paralisação do processo de crescimento entre uma duplicação e outra, em vista do que não seria possível a constatação de um maior número de núcleos nos pontos correspondentes ao fim do processo de duplicação nuclear.

Portanto, pela apreciação dos histogramas de freqüências dos diâmetros nucleares dos neurônios de *Biomphalaria glabrata*, principalmente nas grandes amostras (até a idade adulta, figura 19) não se percebe qualquer evidência da paralisação do crescimento nuclear entre uma duplicação e outra, pois somente haveria tal evidência se ficasse constatada a presença de modas sucessivas e em intervalos correspondentes àqueles da duplicação do volume nuclear.

2) *Tentativa de reconhecimento das classes correspondentes aos diferentes graus de ploidia por meio do teste do X^2* : —

De tôdas as idades nas quais foram obtidos os diâmetros nucleares, a idade de 0 dias foi aquela que mais se prestou à determinação do ponto médio da classe diplóide, já que seria de se esperar maior proporção de núcleos diplóides nessa idade do que nas demais. A freqüência igual a 25 correspondente ao diâmetro 6,0 dos 167 núcleos medidos nessa idade, estaria indicando o valor médio dos diâmetros dos núcleos diplóides. A êsse diâmetro corresponde um volume nuclear igual a 113,09. A partir dêsse volume, foram calculados os volumes esperados dos núcleos com sucessivos graus de plóidia e, a

partir dêstes, os diâmetros correspondentes pelo emprego da fórmula do volume de uma esfera em função do diâmetro, já citada. Os valores calculados para os diâmetros e volumes nucleares e sua correspondência aos respectivos graus de ploidia, constam do Quadro IV.

QUADRO IV

Graus de ploidia, diâmetros e volumes estimados para os núcleos de neurônios de *Biomphalaria glabrata*.

Grau de ploidia	Diâmetro	Volume
2 N	6,00	113,09
4 N	7,56	226,18
8 N	9,52	452,36
16 N	12,00	904,72
32 N	15,12	1.809,44
64 N	19,05	3.618,88
128 N	24,00	7.237,76
256 N	30,24	14.475,52
512 N	38,10	28.951,04
1024 N	48,00	57.902,08

Considerando-se os diâmetros estabelecidos no Quadro IV como os valores centrais das classes de diferentes graus de ploidia, os limites das classes foram estabelecidos pelos pontos equidistantes a dois pontos centrais consecutivos. Dessa forma foi feita a delimitação das classes de diferentes graus de ploidia e, em seguida, foi verificada, em cada uma, as freqüências observadas, obtendo-se os dados contidos no Quadro V.

O cálculo da porcentagem média de poliploidia foi feito da seguinte maneira:

Primeiramente foi calculada a porcentagem de núcleos diplóides em cada idade, levando-se em conta o total de núcleos medidos e o total considerado em cada classe 2 N conforme os dados expostos no Quadro V. Em seguida, considerando-se a porcentagem de núcleos 2 N em uma idade qualquer igual a 100%, a diferença entre a porcentagem de núcleos 2 N dessa idade e da idade seguinte, seria igual à taxa de poliploidia.

Por exemplo, na idade de 0 dias foram observados 91 núcleos diplóides num total de 167, o que dá uma porcentagem de 54,49% de núcleos diplóides. Na idade de 5 dias, os 66 núcleos 2 N em um to-

QUADRO V

Tabela de frequências observadas em cada classe correspondente aos diferentes graus de ploidia, em cada idade, em núcleos de neurônios de *Biomphalaria glabrata*.

Idade	Frequências observadas para diferentes graus de ploidia										Frequência total
	2 N	4 N	8 N	16 N	32 N	64 N	128 N	256 N	512 N	1024 N	
0 dias	91	56	20								167
5 "	66	77	36	8							187
10 "	60	57	28	9	1						155
15 "	59	61	57	23	4	1	0	1			206
20 "	34	53	65	47	17	3	2				221
25 "	11	29	41	62	39	15	3	4			204
30 "	3	16	39	56	37	8	5	1	1		166
35 "	3	22	37	52	31	19	8	2	2		176
40 "	1	17	29	43	33	17	5	4	1		150
adulta	5	22	68	133	122	77	39	15	11	7	499
Total											2.131

tal de 187, correspondem a 35,29%. Portanto, a taxa de poliploidia verificada no intervalo de tempo entre essas duas idades será de:

$$\frac{(54,49 - 35,29)}{54,49} = \frac{100}{x}$$

$$x = 35,24\%$$

Os valores assim obtidos para as porcentagens de poliploidia ocorrida no intervalo entre duas idades consecutivas desde 0 dias até a idade adulta, constam do Quadro VI.

Com os 9 valores da porcentagem de poliploidia contidos no Quadro VI foi obtido o valor médio 27,41% que foi considerado como a porcentagem média de poliploidia.

Os dois valores negativos contidos no Quadro VI só podem ser explicados como sendo devidos aos erros de amostragem. Evidentemente, não é de se esperar uma porcentagem negativa de poliploidia já que seria muitíssimo pouco provável a ocorrência de haploidização durante um processo onde se nota uma tendência contínua de poliploidização.

Para a aplicação do teste do X^2 , as frequências esperadas em cada classe de diferentes graus de ploidia numa idade qualquer desde 5 dias até a idade adulta, foram calculadas aplicando-se a taxa

QUADRO VI

Porcentagens de poliploidia medidas na classe 2 N para cada intervalo entre duas idades consecutivas desde a idade de 0 dias até a idade adulta em núcleos de neurônios de *Biomphalaria glabrata*.

Idade	% de núcleos 2 N	% de poliploidia
0 dias	54,49	
5 "	35,29	35,24
10 "	38,71	-9,69
15 "	28,54	26,01
20 "	15,38	46,30
25 "	5,39	64,95
30 "	1,81	66,42
35 "	1,70	6,08
40 "	0,67	60,59
adulta	1,00	-49,25

média de 27,41% de poliploidia realizada no intervalo de 5 dias, sobre as frequências observadas na idade imediatamente anterior. As etapas do cálculo foram as seguintes:

1) Em cada idade, as frequências das classes correspondentes aos diferentes graus de ploidia foram transformadas proporcionalmente em relação ao mesmo total observado na idade imediatamente superior. Por exemplo, na idade de 0 dias, para o

total de 167 núcleos foram observados 91 na classe 2 N, 56 na classe 4 N e 20 na classe 8 N. Para o total de 187, que corresponde ao total de núcleos observados na idade de 5 dias, seriam observados, na idade de 0 dias, 101,90 núcleos 2 N, 62,71 núcleos 4 N e 22,40 núcleos 8 N.

2) Foi aplicada a taxa de 27,41% de poliploidia em cada classe correspondente a um grau diferente de ploidia. Por exemplo, 27,41% de 101,90 será o número de núcleos que se espera terem passado de 2 N para 4 N no espaço de tempo de 0 a 5 dias. Portanto, o esperado para a frequência de núcleos 2 N na idade de 5 dias, será:

$$101,90 \times 27,41$$

$$101,90 - \left(\frac{\quad}{100} \right) = 73,97$$

Igualmente, 27,41% de 62,71 será o número de núcleos que se espera tenham passado de 4 N para 8 N no espaço de tempo de 0 a 5 dias. Porém, como a classe 4 N recebeu o acréscimo de 27,93 núcleos que vieram da classe 2 N, o esperado para a classe

4 N na idade de 5 dias, será:

$$62,71 \times 27,41$$

$$62,71 - \left(\frac{\quad}{100} \right) + 27,93 = 73,45$$

Da mesma forma, 27,41% de 22,40 será o número de núcleos que se espera tenham passado de 8 N para 16 N no espaço de tempo de 0 a 5 dias. Porém como a classe 8 N recebeu o acréscimo de 17,19 núcleos que vieram da classe 4 N, o esperado para a classe 8 N na idade de 5 dias, será:

$$22,40 \times 27,41$$

$$22,40 - \left(\frac{\quad}{100} \right) + 17,19 = 33,45$$

Finalmente, o esperado para a classe 16 N na idade de 5 dias será 6,14 que correspondem aos núcleos 8 N que passaram a 16 N.

As frequências observadas e esperadas para cada classe de diferentes graus de ploidia nas idades de 5 dias até a idade adulta e os valores de X^2 calculados para cada idade, constam das Tabelas I a IX.

TABELA I

Frequências observadas e esperadas para cálculo do X^2 na idade de 5 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	d ² /f. esp.
2 N	66	73,97	0,86
4 N	77	73,45	0,17
8 N	36	33,45	0,19
16 N	8	6,14	0,56
Total	187	187,01	$X = 1,78$ NS

Limites de significância para 3 g.l.: 5% = 7,82
1% = 11,34

TABELA II

Frequências observadas e esperadas para cálculo do X^2 na idade de 10 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	d ² /f. esp.
2 N	60	39,71	10,37
4 N	57	61,33	0,31
8 N	28	39,15	3,18
16 N	9	12,99	1,56
32 N	1 } 10	1,82 } 14,81	
Total	155	155,00	$X^2 = 15,42$ **

Limites de significância para 3 g.l.: 5% = 7,82
1% = 11,34

TABELA III

Frequências observadas e esperadas para cálculo do χ^2 na idade de 15 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	59	57,88	0,02
4 N	61	76,85	3,27
8 N	57	47,77	1,78
16 N	23	18,86	1,31
32 N	4	4,24	
64 N	1	0,36	
128 N	0	0	
256 N	1	0	
	29	23,46	
Total	206	205,96	$\chi^2 = 6,38$ NS

Limites de significância para 3 g.l.: 5% = 7,32
1% = 11,34

TABELA IV

Frequências observadas e esperadas para cálculo do χ^2 na idade de 20 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	34	45,95	3,18
4 N	53	64,86	2,17
8 N	65	62,32	0,12
16 N	47	34,67	4,39
32 N	17	9,87	5,58
64 N	3	1,96	
128 N	2	0,29	
256 N	0	0,78	
512 N	0	0,29	
	22	13,19	
Total	221	220,99	$\chi^2 = 15,74$

Limites de significância para 4 g.l.: 5% = 9,49
1% = 13,28

TABELA V

Frequências observadas e esperadas para cálculo do χ^2 na idade de 25 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	11	22,78	10,48
4 N	29	44,11	5,18
8 N	41	56,96	4,47
16 N	62	47,94	4,12
32 N	39	23,28	10,62
64 N	15	6,31	19,18
128 N	3	2,10	
256 N	4	0,51	
	22	8,82	
Total	204	203,99	$\chi^2 = 54,05$

Limites de significância para 5 g.l.: 5% = 11,07
1% = 15,09

TABELA VI

Frequências observadas e esperadas para cálculo do χ^2 na idade de 30 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	3	6,50	1,88
4 N	16	19,58	0,65
8 N	39	30,69	2,25
16 N	56	45,76	2,29
32 N	37	36,87	0,00
64 N	8	17,56	5,20
128 N	5	5,12	0,46
256 N	1	3,03	
512 N	1	0,89	
Total	166	166,00	$\chi^2 = 12,73$

Limites de significância para 6 g.l.: 5% = 12,59
1% = 15,09

TABELA VII

Frequências observadas e esperadas para cálculo do χ^2 na idade de 35 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	3	2,31	5,84
4 N	22	13,18	
8 N	37	34,67	
16 N	52	54,43	0,11
32 N	31	44,75	4,22
64 N	19	16,91	0,26
128 N	8	6,17	0,52
256 N	2	2,22	
512 N	2	1,06	
1024 N	0	0,29	
Total	176	175,99	$\chi^2 = 11,11$

Limites de significância para 5 g.l.: 5% = 11,07
1% = 15,09

TABELA VIII

Frequências observadas e esperadas para cálculo do χ^2 na idade de 40 dias.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	1	1,86	0,21
4 N	17	14,31	
8 N	29	28,03	
16 N	43	40,81	0,12
32 N	33	31,33	0,09
64 N	17	18,99	0,21
128 N	5	9,38	2,05
256 N	4	3,10	0,01
512 N	1	1,70	
1024 N	0	0,47	
Total	150	149,98	$\chi^2 = 2,72$ NS

Limites de significância para 6 g.l.: 5% = 12,59
1% = 16,81

TABELA IX

Frequências observadas e esperadas para cálculo do X^2 na idade adulta.

classe	f. obs.	f. esp.	$d^2/f.$ esp.
2 N	5	2,42	6,81
4 N	22	41,96	
8 N	68	85,53	3,59
16 N	133	130,27	0,06
32 N	122	118,90	0,08
64 N	77	71,14	0,48
128 N	39	27,58	4,73
256 N	15	14,21	0,04
512 N	11	6,07	17,40
1024 N	7	0,91	
Total	499	498,99	$X^2 = 33,19$ **

Limites de significância para 7 g.l.: 5% = 14,07

1% = 18,48

Um resumo dos resultados dos testes de X^2 contidos nas Tabelas de I a IX, está exposto no Quadro VII.

QUADRO VII

Resultados obtidos nas idades de 5 dias até a idade adulta, nos testes de X^2 entre frequências observadas nas classes de diferentes graus de ploidia e frequências esperadas pela aplicação da taxa de 27,41% de poliploidia para um intervalo de tempo de 5 dias, em núcleos de neurônios de *Biomphalaria glabrata*.

Idade	Valor de X^2	Limites de significância		Resultado	Tamanho da amostra
		5%	1%		
5 dias	1,78	7,82	11,34	N.S.	187
10 "	15,42	7,82	11,34	**	155
15 "	6,38	7,82	11,34	N.S.	206
20 "	15,74	9,49	13,28	**	221
25 "	54,05	11,07	15,09	**	204
30 "	12,73	12,59	16,81	*	166
35 "	11,11	11,07	15,09	*	176
40 "	2,72	12,59	16,81	N.S.	150
adulta	33,19	14,07	18,48	**	499

N.S. = não significativo ao nível de 5%

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Uma explicação para os seis resultados significativos obtidos pela aplicação do teste do X^2 e expostos no Quadro VII, pode ser sugerida por meio de uma das três seguintes formas ou mesmo por todas elas simultaneamente:

1) Em cada processo de poliploidia não haveria uma duplicação exata do volume nuclear.

Se não houver uma correspondência perfeita entre duplicação cromossômica e duplicação do volume nuclear, os limites estimados para as classes de sucessivos graus de ploidia com base nos valores do diâmetro e do volume dos núcleos relacionados no Quadro IV não estão corretos, o que explicaria a significância para os seis valores de X^2 obtidos.

2) A taxa de 27,41% de poliploidia obtida da própria amostra, estaria diferindo bastante da taxa real realizada.

Nesse caso, seria indicada a obtenção dessa taxa por outro processo ou, se pelo mesmo processo, em uma amostra mais numerosa.

3) A taxa de poliploidia não seria a mesma em tôdas as idades.

Esta nos parece ser a melhor explicação para os resultados obtidos nos testes de X^2 . Isso porque a taxa de 27,41% de poliploidia se aplica bem para explicar as freqüências nas idades de 5 dias, 15 dias, e 40 dias mas não pode ser admitida para explicar as freqüências nas idades de 10 dias, 20 dias, 25 dias e idade adulta. É bastante provável que, para as idades de 30 e 35 dias, se poderia adotar uma taxa de poliploidia próxima de 27,41%.

Essa possível variação da taxa de poliploidia com as diferentes idades é bastante aceitável pois as atividades metabólicas dos organismos variam, evidentemente, com a idade.

3) *Regressão do valor médio do diâmetro nuclear dos neurônios de **Biomphalaria glabrata** sobre a idade em dias.*

A tendência para aumento do volume nuclear com a idade é tão evidente que, para se chegar a

tal conclusão, seria suficiente a comparação entre os histogramas de freqüências dos diâmetros nucleares nas diferentes idades.

Entretanto, parece de algum interêsse a determinação do coeficiente de regressão da média do diâmetro nuclear sôbre a idade em dias para se mostrar, pela comparação da posição dessas médias em relação à reta de regressão, a grande correspondência existente entre aqueles pontos e a reta.

Os dados utilizados para o cálculo do coeficiente de regressão constam da Tabela X e a representação da reta de regressão e dos pontos observados, consta da *Figura 20*.

Evidentemente, as médias dos diâmetros nucleares em cada idade pouco significam no tocante à análise estatística das amostras pois cada idade contém uma mistura de vários grupos de diâmetros, cada um deles correspondente a um dos sucessivos graus de plóidia. Entretanto, é essa a única forma de se poder demonstrar, pela determinação da reta de regressão, o baixo valor dos desvios dos pontos em relação a essa reta. Além disso, a reta também mostra a indiscutível tendência do aumento do diâmetro, pela ocorrência de poliploidia ou de politenia.

TABELA X

Tabela dos valores X correspondentes à idade em dias e dos valores Y correspondentes ao diâmetro médio nuclear dos neurônios de **Biomphalaria glabrata** para cálculo do coeficiente de regressão do diâmetro nuclear médio sôbre a idade.

X	Y	X ²	XY
0	6,97	0	0
5	7,54	25	37,70
10	7,46	100	74,60
15	8,61	225	129,15
20	9,83	400	196,60
25	12,34	625	308,50
30	12,60	900	378,00
35	13,32	1.225	466,20
40	13,65	1.600	546,00

Com os valores da Tabela X foram calculadas as estimativas: $b = 0,1936$

$\hat{a} = 6,3858$

Essas estimativas foram utilizadas para a obtenção da reta de regressão que aparece na *Fig. 20*.

CONCLUSÃO

Da análise estatística utilizada no presente trabalho, os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões relativas ao crescimento nuclear de neurônios de *Biomphalaria glabrata* em diferentes idades desde 0 dias (data da eclosão) até a idade adulta (idades dos indivíduos de dimensões aproximadamente quatro vezes maiores do que as dos exemplares de 45 dias):

1) Há um contínuo crescimento nuclear desde a idade de 0 dias até a idade adulta, o qual pode ser explicado pela ocorrência de sucessivas duplicações do conteúdo cromossômico, consideradas como poliploidia ou como politenia.

2) Pode ser estimado em 0,1936 o valor do coeficiente de regressão da média dos diâmetros nucleares sobre a idade em dias, dentro do período de 0 dias até a idade de 40 dias.

3) Na idade de 0 dias predominam núcleos diplóides.

4) O estado de poliploidia, deduzido do valor do volume nuclear, atingiu, nas idades de 35 dias, 40 dias e idade adulta, o seu mais elevado grau, avaliado em 1024 N.

5) Nos histogramas de frequência não há, na maioria das vezes, correspondência entre as classes de mais alta frequência e os graus de ploidia.

6) Em qualquer das idades estudadas, as distribuições não são tipicamente multimodais, embora apresentem sempre vários graus de ploidia.

7) A ausência de várias modas nas distribuições de cada idade pode indicar a não ocorrência de uma sensível paralisação do processo de poliploi-

dia ou politenia entre duas duplicações cromossômicas sucessivas.

8) A medida que aumenta o tamanho das amostras pela mistura de dados obtidos em diferentes idades, mais o aspecto da distribuição se aproxima do de uma distribuição assimétrica e unimodal.

9) Não deve haver, provavelmente, a mesma intensidade de poliploidia nas diferentes idades.

RESUMO

Os valores dos diâmetros nucleares de neurônios de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) foram analisados estatisticamente na tentativa de se constatar uma possível correspondência entre diâmetro nuclear e grau de ploidia.

Os histogramas de frequências dos diâmetros nucleares em várias idades desde 0 dias até a idade adulta, foram analisados graficamente, não sendo possível a observação de qualquer correspondência consistente entre classe de maior frequência e grau de ploidia.

Foi estimado e aplicado para análise pelo teste do X^2 , um valor médio para a intensidade de poliploidia desde a idade de 0 dias até a idade adulta.

Foi determinada a reta de regressão do valor médio do diâmetro nuclear sobre a idade em dias no período compreendido entre 0 dias e 40 dias.

BIBLIOGRAFIA

- FALLIERI, L. A., SANT'ANA, Y. X. & SCHREIBER, G., 1967 — DNA nos núcleos de neurônios — Resultados preliminares. *Ciênc. Cult.* 19(2):358.
- SCHREIBER, G., 1946 — Estudo cariométrico dos poliplóides de *Coffea*. Pesquisa de citologia quantitativa III. *Bragantia* 7(6):279-298.
- 1947 — O crescimento interfásico do núcleo. Pesquisas cariométricas sobre a espermatogênese dos ofídios. *Mem. Inst. Butantan* 20:113-180.

Fig. 1 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 0 dias.

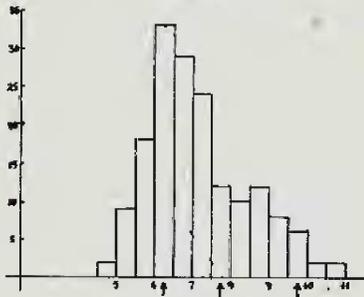


Fig. 2 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 5 dias.

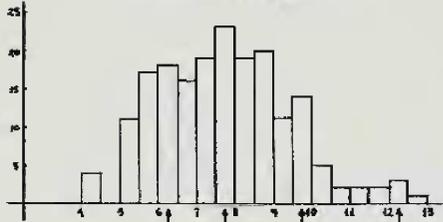


Fig. 3 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 10 dias.

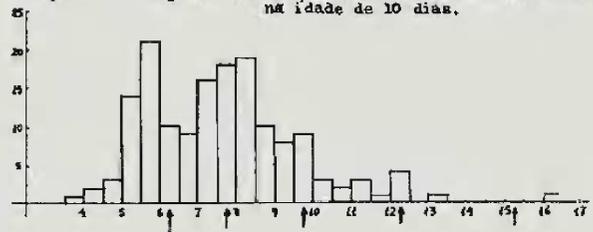


Fig. 4 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 15 dias.

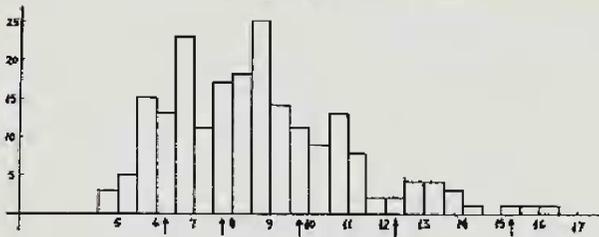


Fig. 5 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 20 dias.

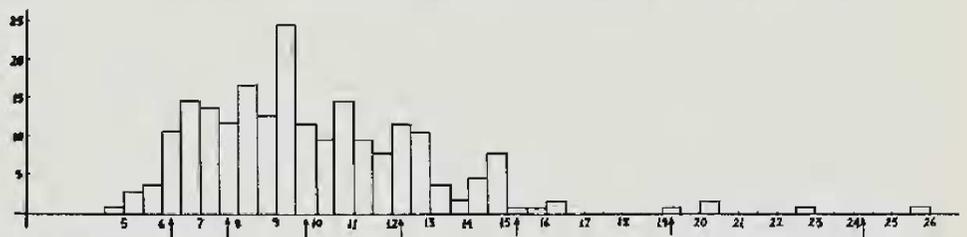


Fig. 6 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 25 dias.

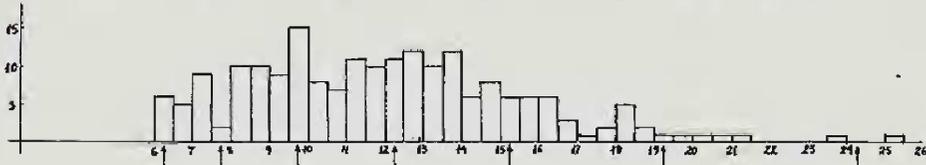


Fig. 11 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 5 dias.

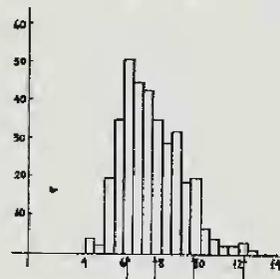


Fig. 7 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 30 dias.

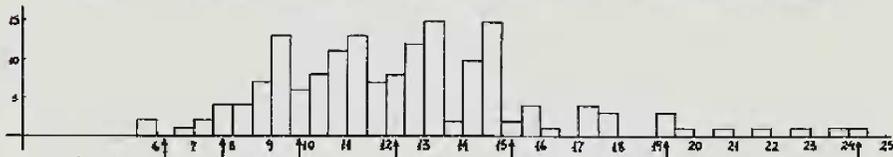


Fig. 8 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 35 dias.

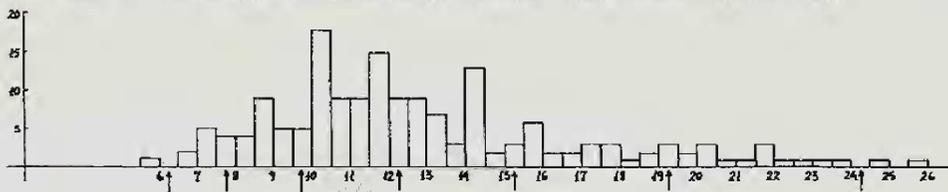


Fig. 12 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 10 dias.

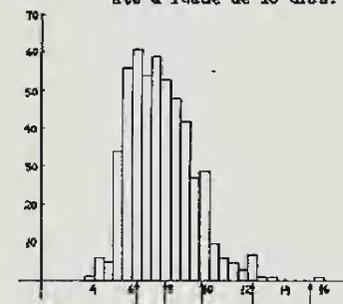


Fig. 9 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade de 40 dias.

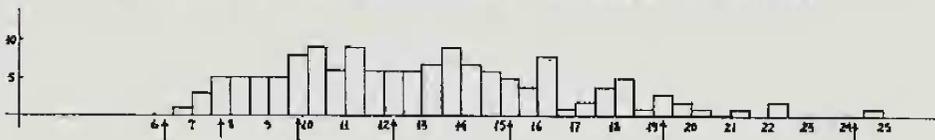


Fig. 10 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares na idade adulta.

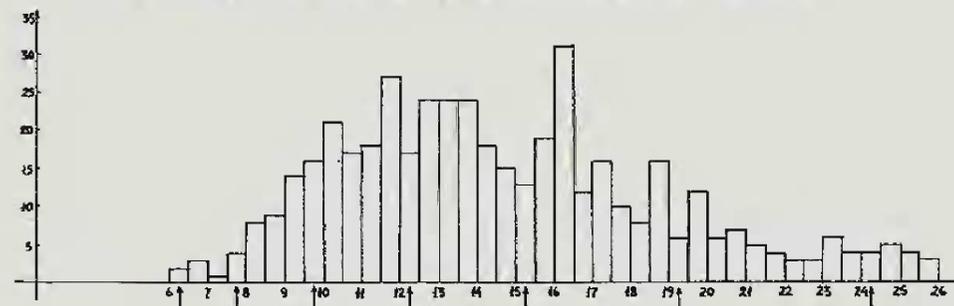


Fig. 13 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 15 dias.

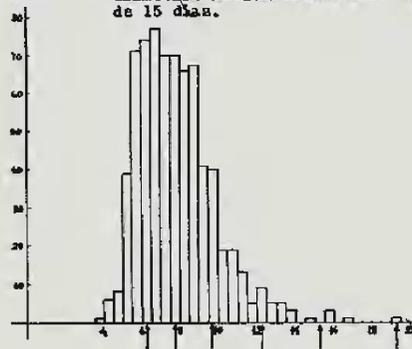


Fig. 14 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 20 dias.

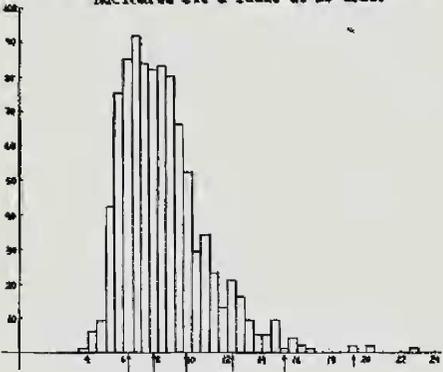


Fig. 16 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 30 dias.

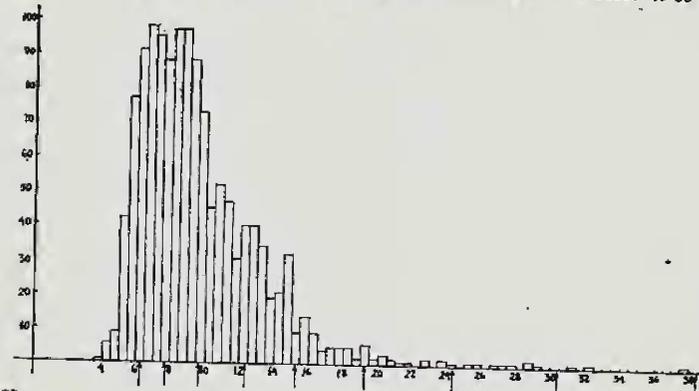


Fig. 15 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 25 dias.

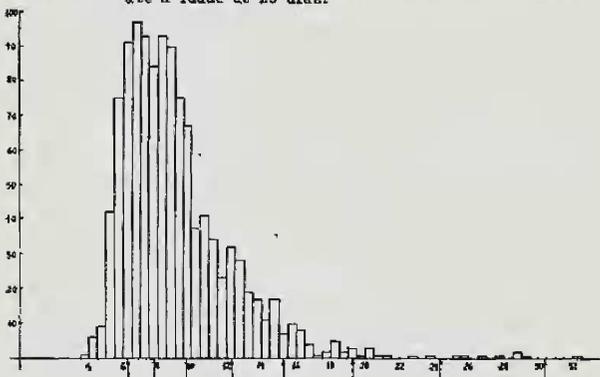


Fig. 17 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 35 dias.

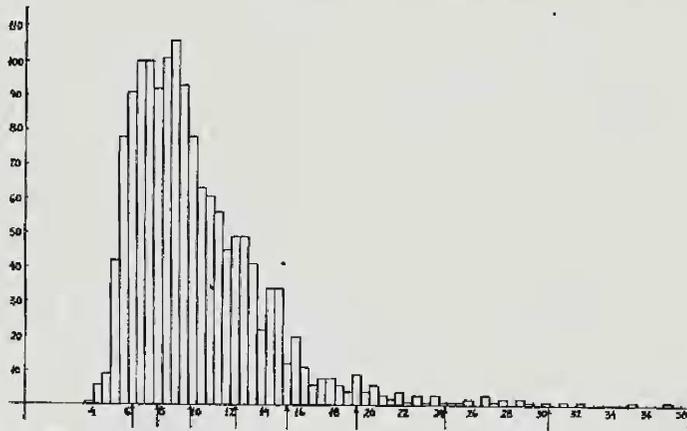


Fig. 18 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade de 40 dias.

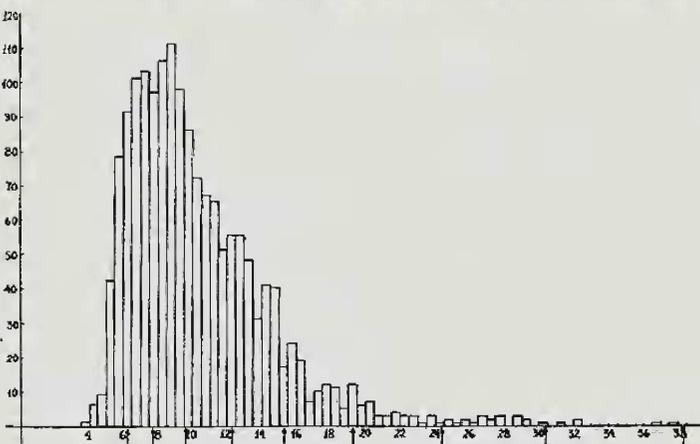


Fig. 20 - Reta de regressão das médias dos diâmetros nucleares em diferentes idades sobre a idade em dias e posição dos pontos observados.

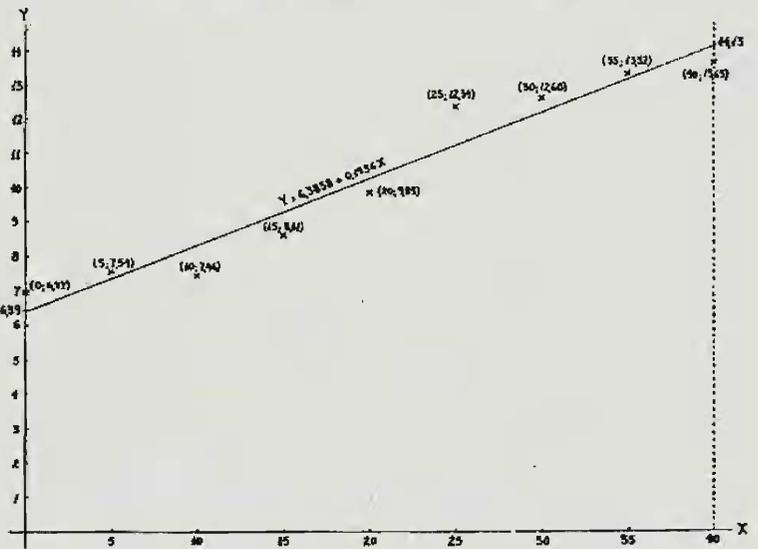


Fig. 19 - Histograma de frequências dos diâmetros nucleares até a idade adulta.

